

# 日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

## I 基本情報

研究開発課題名：抗腫瘍免疫を誘導する改変エクソソームの生体内産生技術の開発

Development of in vivo production technology of engineered exosomes which induce anti-tumor immunity

研究開発実施期間：令和5年4月15日～令和7年3月31日

研究開発代表者 氏名：華山 力成

Rikinari Hanayama

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人金沢大学 ナノ生命科学研究所 教授

Professor, WPI Nano Life Science Institute, Kanazawa University

## II 研究開発の概要

### 1. 研究の背景と目的

エクソソームは細胞間の情報伝達を担う膜小胞として知られ、医療応用でも近年その有用性が注目されている。私達はこれまで、がん抗原-MHC クラス I 複合体、CD80 補助シグナル、IL-2 を同時発現する改変エクソソーム AP-EV を培養細胞への遺伝子導入にて作製することで、マウス生体内への投与で内在性のがん抗原特異的 CD8+T 細胞を活性化させ、強い抗腫瘍効果をもたらすことに成功している (J Extracell Vesicles.14(4):e70035 (2025))。この技術を利用したエクソソーム創薬の実現には、十分量のエクソソームを産生する技術の確立と、生体内における薬物動態・薬効の評価が重要であるが、世界的にも未だに確立されておらず、技術革新が求められている。

一般的にエクソソーム製剤は培養細胞を用いて製造されるが、産生量が低くヒトへの投与量を十分に回収することが困難である。また、精製過程で種々の夾雑物が混入し副反応を引き起こす可能性が指摘されている。そこで本研究では、改変エクソソーム作製技術に、送達技術・薬物動態評価技術を有機的に連携させることで、強い抗腫瘍効果をもたらす mRNA 医薬の開発を進める。特に、がん細胞はエクソソームを多量に分泌するので、がん細胞への指向性や選択性を持つ脂質ナノ粒子 (LNP) の開発により、がん細胞に mRNA を選択的に送達し、がん細胞から改変エクソソームを放出させることで、周囲のがん抗原特異的 CD8+T 細胞を効率的に増強させる。その際、mRNA-LNP のがん細胞指向性の評価法として、蛍光色素を mRNA-LNP に内包化する技術と mRNA-LNP のポジトロン放出核種標識技術を活用する。特に、抗腫瘍効果や腫瘍組織での T 細胞浸潤性・活性化を評価して薬力学解析を行い、そのデータを送達技術開発へと feedback して改良することで、高効率化・高機能化を目指す。

## 2. 研究体制と開発方針

金沢大学の華山力成・山野友義を中心とし、同じく金沢大学の中村孝司、国立がん研究センターの安永正浩、長崎大学の向井英史、日産化学株式会社など複数機関の協力により実施された。mRNA 医薬開発、LNP 製剤設計、動態評価技術、免疫学的評価までの一連の工程を分担・連携し、基礎から応用に至る幅広い検証を行った。開発項目は主に、AP-EV mRNA の構築、LNP 送達系の設計、抗腫瘍効果の評価、薬物動態および薬効の可視化、PET による追跡技術からなる。

## 3. AP-EV mRNA の開発と機能評価

最初に、がん抗原を提示する MHC クラス I 複合体と共刺激因子 IL-2 をエクソソームのマーカー分子テトラスパニンに融合させたキメラタンパク質をコードする mRNA (AP-EV mRNA) を設計した。この mRNA は、翻訳効率向上のためにコドン最適化が施され、3'UTR にはヒト  $\alpha$  グロブリン配列と長鎖ポリ A 配列を付加した高効率発現型である。担がんマウスモデルには大腸がん細胞 MC38 を用いる為、MC38 が有するネオアンチゲン RPL18 を抗原提示する AP-EV(RPL18)mRNA を構築した。加えて、モデル抗原 OVA に対応する AP-EV(OVA)mRNA も作製した。

MC38 担がんマウスに対する投与実験では、AP-EV mRNA により誘導された改変エクソソームの作用で、CD8+T 細胞のクローン増殖が確認された。これは、本手法が抗原特異的な T 細胞応答を体内で誘導できるという仮説を裏付けるものであり、mRNA 医薬による免疫制御戦略の有効性を示す成果である。

## 4. LNP 送達技術の最適化と抗腫瘍効果の検証

次に、上記 mRNA を効果的にがん細胞へ届けるための送達技術として、HER2 ナノボディを修飾した脂質ナノ粒子 (HER2-LNP) を開発した。LNP 表面に修飾された PEG 脂質にマレイミド基を導入し、還元処理を施したナノボディを共有結合させることで、高い特異性を持つ LNP を構築した。この HER2-LNP は、HER2 を過剰発現する MC38 細胞や E.G7-OVA 細胞への選択的な取り込みが *in vitro* で確認され、さらに HER2 抗体存在下で取り込みが抑制されることから、HER2 との結合を介した機構であることが明らかとなった。

*in vivo* でも HER2-LNP は腫瘍への集積性を示し、PEG 脂質およびナノボディ濃度の最適化により、腫瘍内での mRNA 発現量が向上した。さらに、HER2-E.G7-OVA を皮下移植した担がんマウスに AP-EV(OVA)mRNA を HER2-LNP で投与した結果、未修飾 LNP と比較して明らかな抗腫瘍効果が確認された。これは、がん細胞に選択的に送達された mRNA によって生体内で改変エクソソームが産生され、その結果として腫瘍局所で免疫系が活性化されたことを意味している。

## 5. 薬物動態・薬効の可視化と解析技術の構築

送達された LNP の体内動態と薬効を可視化するため、蛍光色素 DiR と DiD を活用したイメージング解析が行われた。DiR は *in vivo* イメージングに優れ、投与後の腫瘍への集積性が全身スキャンで観察された。DiD は *ex vivo* 臓器イメージングや組織切片解析に適しており、腫瘍血管から LNP が漏出し、がん細胞へ分布する様子が高解像度で捉えられた。

さらに、腫瘍組織および脾臓において、CD3+T 細胞や IFN- $\gamma$  産生細胞の蛍光染色を行うことで、LNP 投与後の免疫活性化の証拠が得られた。これは mRNA 医薬の抗腫瘍効果が、免疫系の賦活を通じて生じていることを直接的に示す重要な指標である。

## 6. PET を用いた高精度動態追跡技術の導入

PET 解析には  $^{64}\text{Cu}$  を標識核種として利用し、Luc-mRNA を  $^{64}\text{Cu}$ -オリゴヌクレオチドと二本鎖形成させること

で、LNP に内包可能な放射性標識体を構築した。この標識 mRNA-LNP は物理化学的性質が安定しており、マウスへの投与後に PET スキャンを行うことで、血中滞留性、組織分布、腫瘍集積性を定量的に把握できた。

解析の結果、一般的な mRNA-LNP とは異なり、今回開発した LNP は血中において長時間滞留しながらも肝集積を抑制し、腫瘍局所への集積が高いことが示された。これは PEG 脂質の最適設計により、apoE 介在性の肝クリアランスを回避できたためと推測され、がん治療用の mRNA 医薬送達において極めて有望な技術であるといえる。

## 7. 総括と今後の展望

本研究は、がん免疫療法における新しい戦略として、「体内でエクソソームを作らせる mRNA 医薬」の有効性を多角的に検証したものである。がん細胞に選択的に送達された mRNA がエクソソームを分泌させ、そのエクソソームが免疫細胞を活性化するという一連の流れが、*in vitro* および *in vivo* のデータにより明確に裏付けられた。mRNA-LNP、蛍光イメージング、PET など複数の評価技術を組み合わせたことにより、製剤設計から作用機序の可視化までを一貫して行うことができた点も、本研究の特徴である。

今後は、mRNA 配列や LNP 組成のさらなる最適化に加えて、免疫抑制因子を解除する mRNA との併用、あるいは直接がん細胞死を誘導する因子の導入など、多様な応用展開が見込まれる。また、得られた評価系を用いた臨床移行に向けたプロトコルの整備も進められるべきである。

なお、本研究成果はすでに日産化学株式会社との共同で国際特許出願が完了しており（WO/2021/172596, WO/2023/033124）、今後も新たな成果に基づいた追加出願が予定されている。産学連携のもと、研究成果の実用化に向けた取り組みを加速していく方針である。

## 1. Background and Objectives

Exosomes are vesicles involved in intercellular communication and are gaining attention in medical applications. We previously created engineered exosomes (AP-EVs) expressing a tumor antigen–MHC class I complex, CD80, and IL-2 via gene transduction. These activated tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells in mice, showing strong antitumor effects (J Extracell Vesicles.14(4):e70035 (2025)).

To advance exosome-based drugs, large-scale production and in vivo pharmacokinetic evaluation are essential but remain undeveloped. Exosomes from cultured cells yield low quantities and may contain impurities. This study integrates exosome engineering with delivery and evaluation technologies to develop mRNA drugs that trigger tumor-specific immune responses. Lipid nanoparticles (LNPs) targeting cancer cells are used to deliver mRNA, inducing engineered exosome release that stimulates CD8<sup>+</sup> T cells. Fluorescent and PET labeling will assess delivery and guide optimization.

## 2. Research Framework and Strategy

The project is led by Rikinari Hanayama and Tomoyoshi Yamano at Kanazawa University, in collaboration with Takashi Nakamura (also at Kanazawa University), Masahiro Yasunaga at the National Cancer Center, Hidefumi Mukai at Nagasaki University, and Nissan Chemical Corporation. Key components included AP-EV mRNA construction, LNP design, antitumor testing, in vivo imaging, and PET tracking.

## 3. AP-EV mRNA Design and Evaluation

We designed mRNA encoding chimeric proteins combining MHC I–tumor antigen and IL-2 with exosomal tetraspanins. Codon optimization and enhanced 3'UTR sequences improved expression. Using the MC38 mouse colon cancer model, we created AP-EV mRNAs targeting RPL18 (a neoantigen) and OVA (a model antigen).

In tumor-bearing mice, AP-EV mRNA induced exosomes triggered clonal expansion of CD8<sup>+</sup> T cells, supporting the mRNA's ability to elicit antigen-specific immune responses in vivo.

## 4. Optimizing LNP Delivery and Efficacy

We developed HER2-targeting LNPs (HER2-LNPs) by attaching HER2 nanobodies to PEG lipids. These LNPs selectively entered HER2-positive cells, confirmed via antibody blocking studies.

In vivo, HER2-LNPs accumulated in tumors. Optimized PEG/nanobody concentrations enhanced mRNA expression in tumors. Mice injected with HER2-LNPs carrying AP-EV(OVA)mRNA showed stronger antitumor effects than with unmodified LNPs, indicating localized immune activation via engineered exosomes.

## 5. Imaging Pharmacokinetics and Efficacy

Fluorescent dyes DiR and DiD enabled tracking of LNPs. DiR visualized whole-body tumor accumulation, while DiD showed detailed distribution in tissues. Immunostaining for CD3<sup>+</sup> and IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells confirmed immune activation after LNP delivery, proving the immunological mechanism of mRNA-based antitumor effects.

## 6. PET-Based Tracking

For PET imaging, Luc-mRNA was radiolabeled with <sup>64</sup>Cu via hybridized oligonucleotides. The labeled mRNA-LNPs remained stable and allowed detailed tracking of blood retention and tumor accumulation.

Unlike conventional LNPs, our design reduced liver uptake and enhanced tumor targeting, likely by avoiding apoE-mediated clearance through optimized PEG lipids—highlighting its promise in cancer mRNA delivery.

## 7. Conclusion and Outlook

This study validates a new cancer immunotherapy strategy: mRNA drugs that trigger exosome production in tumors to activate immunity. In vitro and in vivo data confirmed this mechanism.

Combining mRNA-LNPs with fluorescence and PET imaging enabled comprehensive evaluation. Future plans include further mRNA/LNP optimization and combining with other immune therapies. Clinical translation will also be pursued, supported by existing international patents with Nissan Chemical (WO/2021/172596, WO/2023/033124). The project continues to move toward practical application through industry-academic collaboration.